

530,712

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international(43) Date de la publication internationale  
22 avril 2004 (22.04.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2004/033696 A2**(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12N 15/86(74) Mandataires : VIALLE-PRESLES, Marie José etc.;  
CABINET ORES, 36, rue de Saint-Petersbourg, F-75008  
Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2003/002964

(22) Date de dépôt international : 8 octobre 2003 (08.10.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :

02/12472 8 octobre 2002 (08.10.2002) FR

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC,  
SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*)  
: INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE  
AGRONOMIQUE [FR/FR]; 147, rue de l'Université,  
F-75007 Paris (FR). ECOLE NATIONALE VETERI-  
NAIRE D'ALFORT [FR/FR]; 7, avenue du Général de  
Gaulle, F-94704 Maisons-Alfort Cedex (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) :  
ELOIT, Marc [FR/FR]; 49, avenue Joffre, F-94100  
Saint-Maur-des-Fosses (FR). KLONJKOWSKI,  
Bernard [FR/FR]; 7, allée Raymond Nègre, F-94340  
Joinville-le-Pont (FR).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapportEn ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: RECOMBINANT ADENOVIRAL VECTORS AND APPLICATIONS THEREOF

(54) Titre : VECTEURS ADENOVIRAUX RECOMBINANTS ET LEURS APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention relates to novel recombinant adenoviruses which can be obtained from a replicating adenovirus by deleting all or part of the region of the genome of said replicating adenovirus corresponding to that located in the genome of canine adenovirus type 2 (GenBank J04368) between positions 311 and 499, the aforementioned deletion comprising all or part of the region of the genome of the original replicating adenovirus corresponding to that located between positions 311 and 401 in the genome of canine adenovirus type 2. The invention also relates to the uses of said adenoviruses, particularly for therapeutic purposes.

(57) Abrégé : La présente invention est relative à de nouveaux adénovirus recombinants susceptibles d'être obtenus à partir d'un adénovirus répliquatif par délétion de tout ou partie de la région du génome dudit adénovirus répliquatif correspondant à celle située, dans le génome de l'adénovirus canin de type 2 (GenBank J04368), entre les positions 311 et 499, ladite délétion comprenant tout ou partie de la région du génome de l'adénovirus répliquatif d'origine correspondant à celle située entre les positions 311 et 401 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2, ainsi qu'à leurs utilisations, notamment à des fins thérapeutiques.

WO 2004/033696 A2

## VECTEURS ADENOVIRAUX RECOMBINANTS ET LEURS APPLICATIONS.

La présente invention est relative à de nouveaux adénovirus recombinants, et à leur procédé de préparation, ainsi qu'à leurs utilisations comme vecteurs d'expression et de transfert de gène, à des fins vaccinales ou à des fins thérapeutiques comme le traitement du cancer.

Les adénovirus sont des virus nus possédant un génome linéaire à ADN double brin d'environ 30-40 kpb, flanqué de courtes séquences inversées répétées (ITR).

Le génome de l'adénovirus est organisé en unités de transcriptions précoces (E1 à E4) et en une unité tardive (MLTU) composée de cinq familles de transcrits (L1 à L5) dont l'expression est séparée par l'initiation de la réplication de l'ADN viral.

La phase précoce débute deux heures après l'infection par la transcription et l'expression séquentielle des régions E1A puis E4, presque simultanément E3 et E1B, puis E2A et enfin E2B. La région immédiatement précoce E1A code pour des transactivateurs des autres gènes précoces de l'adénovirus (E1B, E2, E3 et E4) ainsi que de gènes cellulaires. Huit heures après l'infection, la réplication de l'ADN viral débute. La phase tardive qui commence douze heures après l'infection est caractérisée par l'extinction de la synthèse des protéines cellulaires au profit des protéines virales tardives qui entrent dans la composition structurale de la particule adénovirale, et participent à l'assemblage du virion et à sa libération en affectant l'intégrité structurale de la cellule infectée.

Les adénovirus présentent un attrait particulier pour le développement de vecteurs viraux, du fait de leurs caractéristiques et de la quantité de connaissances disponibles sur leur organisation génétique et leur biologie.

Différentes stratégies de construction ont été envisagées selon que l'objectif est d'obtenir un virus réplcatif, capable de se multiplier chez l'hôte (humain ou animal), ou un virus non-réplcatif incapable de se multiplier chez l'hôte.

La construction d'un vecteur non-répliatif implique de déléter une région essentielle à la réplication virale. Les virus résultants, qui sont incapables de se répliquer et par conséquent de produire des particules infectieuses dans des cellules permissives à l'infection par le virus sauvage correspondant, sont produits dans des lignées cellulaires modifiées capables de fournir en trans les produits des gènes délétés.

Une stratégie couramment utilisée consiste à insérer un gène hétérologue dans la partie gauche du génome entre l'ITR gauche et la région E1, en lieu et place du promoteur et de la région codante du gène E1A (délétion partielle de E1) et éventuellement du gène E1B (délétion totale de la région E1). Les virus délétés pour E1A sont incapables de se répliquer dans les cellules qui ne complètent pas les fonctions de E1A. Ils sont cependant capables d'exprimer des quantités importantes de protéine exogène dans les cellules infectées.

De nombreux vecteurs adénoviraux humains (Ad2 et Ad5) délétés de la région E1 et éventuellement de la région E3 ont été construits, essentiellement à des fins de thérapie génique humaine. Afin d'améliorer ces vecteurs, des mutations (région E2) ou des délétions supplémentaires (région E2 ou E4) ont été introduites.

Des vecteurs adénoviraux non-répliatifs canins délétés de la totalité de la région E1 ont également été développés pour des applications de thérapie génique humaine [KLONJKOWSKI et al., Human Gene Therapy, 8, 2103-2115, 1997, délétion des positions 411 à 2898 de Cav2 ; Demande WO 95/14101 et Brevet US 5837531 au nom de RHONE POULENC RORER ; KREMER et al., J. Virol., 74, 505-512, 2000, délétion des positions 412 à 2497 de Cav2).

Ces vecteurs non répliatifs ont montré une bonne efficacité de transfert de gènes dans de nombreux tissus. Ils présentent cependant un certain nombre d'inconvénients, en particulier pour le transfert de gènes dans des cellules en division active comme les cellules tumorales. Dans ces cellules, on observe une extinction rapide de l'expression du

gène transféré liée à la perte du vecteur extrachromosomique au cours des divisions successives.

La construction d'un vecteur répliatif impose de ne supprimer aucune séquence du génome viral essentielle à sa  
5 répliation, et à la production de particules virales infectieuses chez l'hôte (cycle viral productif). On ne connaît à l'heure actuelle, chez les adénovirus, qu'un petit nombre de sites d'insertion de séquences hétérologues permettant de satisfaire à ces exigences.

10 Des vecteurs répliatifs ont été obtenus par insertion de gènes hétérologues dans des régions non-essentiellles comme la région E3 et la partie droite du génome entre l'ITR droite et les séquences de régulation transcriptionnelle du promoteur E4. Des vecteurs répliatifs  
15 ont également été obtenus par insertion d'un gène hétérologue dans la partie gauche du génome entre l'ITR gauche et la région E1, sous réserve de conserver des gènes E1 fonctionnels. De façon plus précise, l'insertion d'une séquence hétérologue entre les positions 455 et 917 de  
20 l'adénovirus humain (Ad5) qui inactive le gène E1A par délétion du promoteur et d'une partie de la région codante de E1A, est compensée par l'insertion d'une copie de ce gène en position ectopique dans le vecteur (ELOIT et al., J. Gen. Virol., 76, 1583-1589, 1995).

25 Des vecteurs répliatifs ont été construits de la sorte à partir d'adénovirus humains (ELOIT et al., précité), bovins (MITTAL et al., J. Gen. Virol., 76, 93-102, 1995), ovins (XU et al., Virology, 230, 62-71, 1997), aviaires (MICHOU et al., J. Virol., 73, 1399-1410, 1999 ; SHEPPARD et  
30 al., Arch. Virol., 143, 915-930, 1998, canins (Cav2 ; Demande Internationale WO 98/00166 et Brevet US 6090393, au nom de RHONE MERIEUX ; Demande Internationale WO 91/11525 et Brevet US 5616326, au nom de l'UNIVERSITE de GLASGOW, MORRISON et al., Virology, 293, 26-30, 2002) et porcins (REDDY et al., J.  
35 Gen. Virol., 80, 563-570, 1999 ; TUBOLY et al., J. Gen. Virol., 82, 183-190, 2001).

Ces vecteurs adénoviraux répliatifs ont été développés essentiellement pour des applications vaccinales.

Ils ont de manière générale, démontré une grande efficacité lors de l'induction de réponses immunes, aussi bien pour ce qui concerne la réponse en anticorps que la réponse en CTL (pour une revue voir ELOIT, Virologie, 2, 109-120, 1998 et  
5 KLONJKOWSKI et al., In « Adenoviruses : basic biology to gene therapy », pp. 163-173, P. Seth, Ed., R. G. Landes Company, Austin Texas, USA).

Ces vecteurs réplikatifs présentent cependant quelques inconvénients :

- 10 - ils posent des problèmes de biosécurité liés au risque de diffusion de tels virus réplikatifs,
- la quantité importante de particules virales produite par les cellules infectées entraîne l'induction d'une réponse immune élevée contre le vecteur et limite  
15 l'efficacité des injections de rappel,
- la neutralisation par les anticorps maternels de l'antigène vaccinal relargué à partir de cellules détruites par l'infection, diminue l'efficacité de ces vecteurs réplikatifs chez le jeune.

20 Il apparaît qu'on ne dispose à l'heure actuelle d'aucun adénovirus recombinant permettant de transduire efficacement des cellules, en particulier les cellules en division comme les cellules tumorales sans présenter de risques de dissémination dans l'environnement.

25 En choisissant comme modèle expérimental l'adénovirus canin de type 2 (Cav2), les Inventeurs ont recherché s'il était possible d'identifier de nouveaux sites d'insertion permettant d'obtenir des adénovirus recombinants réplikatifs.

30 Ils ont ainsi constaté que la délétion d'une petite portion du début de la région située entre la fin de l'ITR gauche et le début de la séquence codant pour E1A n'affectaient pas la capacité des adénovirus à répliquer leur génome et à se multiplier chez un hôte permissif ;  
35 l'emplacement de cette délétion peut donc constituer un nouveau site d'insertion de gènes hétérologues.

En outre, les Inventeurs ont constaté que, de manière surprenante, d'autres délétions dans la même région

permettaient d'obtenir des adénovirus capables de répliquer leur génome chez un hôte permissif, mais incapables de se multiplier. Ces adénovirus seront dénommés ci-après « adénovirus pseudo-réplicatifs ».

5 Dans ce qui suit, les positions des différentes régions du génome adénoviral sont définies par référence aux positions des régions correspondantes, (c'est à dire contenant des éléments de fonction similaire) du génome de l'adénovirus canin de type 2 dans la séquence GenBank J04368.

10 Ainsi, la région située entre la fin de l'ITR gauche et le début de la séquence codant pour E1A, correspond à celle située entre la position 311 et la position 499 dans la séquence génomique GenBank J04368 de l'adénovirus canin de type 2.

15 La présente invention a pour objet un adénovirus recombinant susceptible d'être obtenu à partir d'un adénovirus réplcatif par délétion de tout ou partie de la région du génome dudit adénovirus réplcatif correspondant à celle située, dans le génome de l'adénovirus canin de type 2  
20 (GenBank J04368), entre les positions 311 et 499, ladite délétion comprenant tout ou partie de la région du génome de l'adénovirus réplcatif d'origine correspondant à celle située entre les positions 311 et 401 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2.

25 Selon un premier mode de réalisation d'un adénovirus recombinant conforme à l'invention, la portion délétée est constituée par tout ou partie de la région du génome de l'adénovirus réplcatif d'origine correspondant à celle située entre les positions 311 et 319 dans le génome de  
30 l'adénovirus canin de type 2 ; cette délétion permet d'obtenir un adénovirus recombinant réplcatif capable de se multiplier chez un hôte permissif à l'infection par l'adénovirus sauvage d'origine (cycle viral productif).

Selon un second mode de réalisation d'un  
35 adénovirus recombinant conforme à l'invention, la portion délétée comprend tout ou partie de la région du génome de l'adénovirus réplcatif d'origine correspondant à celle située entre les positions 318 et 401 dans le génome de

l'adénovirus canin de type 2 ; cette délétion permet  
avantageusement d'obtenir des adénovirus pseudo-réplicatifs,  
c'est à dire capables de se répliquer mais incapables de  
produire des particules virales infectieuses et donc  
5 incapables de se multiplier (cycle abortif) chez un hôte  
permissif à l'infection par l'adénovirus sauvage d'origine.

L'obtention des adénovirus pseudo-réplicatifs  
conformes à l'invention implique notamment la suppression de  
tout ou partie des signaux d'encapsidation putatifs du type  
10 5'-TTTA/G-3'  $A_X$ ,  $A_{XI}$ , et  $A_{XII}$  (situés respectivement en  
positions 341-344, 377-380, et 388-391, dans la séquence de  
Cav2 GenBank J04368).

La portion délétée dans ces adénovirus pseudo-  
réplicatifs peut comprendre en outre :

15 - tout ou partie de la région du génome de  
l'adénovirus réplcatif d'origine correspondant à celle  
située entre les positions 311 et 319 dans le génome de  
l'adénovirus canin de type 2 ; et/ou

- tout ou partie de la région du génome de  
20 l'adénovirus réplcatif d'origine correspondant à celle  
située entre les positions 400 et 439 dans le génome de  
l'adénovirus canin de type 2 ; cette délétion supprime  
notamment la boîte TATA du promoteur d'E1A (située en  
position 409 dans la séquence de Cav2 GenBank J04368) ;

25 et/ou

- tout ou partie de la région du génome de  
l'adénovirus réplcatif d'origine correspondant à celle  
située entre les positions 438 et 499 dans le génome de  
l'adénovirus canin de type 2 ; cette délétion supprime  
30 notamment le site d'initiation de la transcription d'E1A  
(situé en position 439 dans la séquence de Cav2 GenBank  
J04368).

Dans tous les cas, les adénovirus recombinants  
(réplicatifs ou pseudo-réplicatifs) conformes à l'invention  
35 conservent les séquences de l'ITR gauche indispensables à la  
réplication, à l'activation de la transcription (4 motifs  
GGTCA répétés situés entre les positions 62 et 99 dans le  
génome de Cav2) ainsi que les signaux d'encapsidation  $A_I$  de

type 5'-TTTGN<sub>8</sub>CG-3', et A<sub>11</sub> à A<sub>x</sub> de type 5'-TTTA/G-3' (situés respectivement aux positions 197-200, 206-209, 213-216, 226-232, 239-242, 250-253, 258-261, 272-275 et 306-309 dans le génome de Cav2). Ils conservent également la totalité de la  
5 séquence codante d'E1A ainsi que des régions du gène E1 situées en aval de celle-ci (signal de polyadénylation d'E1A et région E1B).

Selon un mode de réalisation préféré d'un adénovirus recombinant conforme à l'invention, il comprend en  
10 outre au moins une séquence hétérologue d'intérêt insérée dans son génome.

Pour la construction d'un adénovirus recombinant conforme à ce mode de réalisation, ladite séquence hétérologue sera, dans le cas d'un adénovirus répliquatif,  
15 insérée dans la région du génome correspondant à celle située entre les positions 311 et 319 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2.

Dans le cas d'un adénovirus pseudo-répliquatif, ladite séquence hétérologue peut également être insérée dans  
20 cette région, ou à tout autre endroit de la région du génome correspondant à celle située entre les positions 311 et 499 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2. L'insertion dans cette région peut s'effectuer en lieu et place de la portion déléetée ou à proximité de celle-ci.

On peut également insérer une séquence hétérologue dans un quelconque des sites qui sont habituellement utilisés à cet effet pour la construction d'adénovirus répliquatifs. L'insertion peut par exemple être effectuée dans la région E3, ou dans la région située entre  
25 la région E4 et l'ITR droite, comme décrit dans le Brevet US 6090393, ou dans la portion 3' de l'ITR droite, comme décrit dans le Brevet US 5616326.

On entend par « séquence hétérologue », toute séquence autre que celle comprise entre les positions 311 et  
35 499 du génome dudit adénovirus sauvage.

A titre d'exemples non-limitatifs, on peut citer :



- des gènes codant pour un antigène vaccinal, par exemple les gènes *gag* ou *env* du virus de l'immunodéficience féline (FIV), la protéine S, M ou N du coronavirus félin, une protéine de capsid de parvovirus canin ou félin, la  
5 glycoprotéine G du virus de la rage ou la protéine Hap-1 de *Leptospira* sp., etc.

- des gènes correcteurs utilisables en thérapie génique, par exemple celui de l'érythropoïétine (Epo), du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), de  
10 la neurotrophine 3 (NT-3) ou du facteur atrial natriurétique (ANF), etc. ;

- des gènes utilisables pour le traitement du cancer, par exemple celui de l'IL-2, de l'IFN $\gamma$ , etc.

Des adénovirus recombinants conformes à  
15 l'invention peuvent en particulier être issus d'adénovirus de mammifères, et notamment d'adénovirus canins, en particulier d'adénovirus canins de type 2.

Les adénovirus recombinants conformes à la présente invention peuvent être préparés par des techniques  
20 usuelles, bien connues en elles-mêmes de l'homme de l'art (cf. par exemple GRAHAM et PREVEC (Manipulation of Adenovirus Vectors, Methods Mol. Biol., 7, 109-128, 1991), notamment par des techniques comprenant : (i) la génération de génomes recombinants chez *E.coli* par des techniques classiques de  
25 double recombinaison homologue et (ii) la transfection des génomes recombinants ainsi obtenus dans des lignées cellulaires appropriées permettant l'amplification desdits génomes et leur encapsidation dans des particules virales infectieuses.

30 On pourra par exemple utiliser des techniques de recombinaison homologue chez *E.coli*, telles que celles décrites par CHARTIER et al., (J. Virol., 70, 7, 4805-4840, 1996) et dans le Brevet US 6110735 au nom de TRANSGENE ou bien celles décrites par CROUZET et al. (Proc. Nat. Acad. Sci.  
35 USA, 94, 1414-1419, 1997). Ces procédés sont basés sur une recombinaison homologue intermoléculaire entre une molécule d'ADN « receveuse » contenant le génome complet d'un adénovirus, et une molécule d'ADN « donneuse » comprenant une

séquence hétérologue à insérer dans ledit génome, flanquée de séquences homologues à celles de la région du génome adénoviral où l'on souhaite effectuer l'insertion. La molécule receveuse est linéarisée par clivage à un site de restriction unique dans le génome de l'adénovirus, situé au  
5 niveau du site d'insertion. La sélection des génomes recombinants repose ensuite sur la circularisation de la molécule receveuse.

Ces procédés présentent donc l'inconvénient de ne  
10 pouvoir insérer ladite séquence hétérologue que dans une région comprenant un site de restriction unique dans le génome de l'adénovirus.

Les Inventeurs ont maintenant mis au point un procédé d'insertion d'une séquence hétérologue dans un  
15 adénovirus, qui ne nécessite pas la linéarisation du génome de l'adénovirus par clivage au niveau du site d'insertion

Ce procédé diffère de celui décrit par CHARTIER et al. en ce que :

1) le fragment d'ADN hétérologue (molécule  
20 donneuse) à insérer dans le génome de l'adénovirus (molécule receveuse), comprend un marqueur de sélection permettant d'isoler les plasmides recombinants sur leur double résistance à l'ampicilline et à la kanamycine, et

2) ledit fragment est co-transformé avec une  
25 molécule receveuse, soit sous forme circulaire, soit sous forme linéarisée par clivage au niveau d'un site de restriction situé en dehors du site d'insertion.

En conséquence, la présente invention a également pour objet un procédé de préparation d'un adénovirus  
30 recombinant par recombinaison intermoléculaire homologue dans une cellule procaryote caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

α) introduction dans ladite cellule procaryote:  
(i) d'un plasmide comprenant le génome d'un adénovirus et un  
35 premier gène de sélection ; et (ii) d'un fragment d'ADN préalablement linéarisé comprenant une séquence hétérologue à insérer dans ledit génome flanquée de séquences homologues à celles flanquant le site dudit plasmide où doit s'effectuer

l'insertion, et incluant un second gène de sélection, différent du premier ; et

5                   β) culture de ladite cellule procaryote dans des conditions sélectives, afin de permettre la génération et la sélection de cellules contenant des plasmides recombinants exprimant le premier et le second gène de sélection, et

                  γ) isolement du génome dudit adénovirus recombinant à partir des cellules sélectionnées.

10                   On entend par : « conditions sélectives », des conditions de culture dans lesquelles le premier et le second agent de sélection (par exemple antibiotique) sont présents à des concentrations ne permettant pas la multiplication des cellules non-transformées mais permettant la multiplication des cellules co-transformées.

15                   Selon un premier mode de réalisation de l'invention, le plasmide utilisé en α) est sous forme circulaire.

20                   Selon un second mode de réalisation de l'invention, le plasmide utilisé à l'étape α) est préalablement linéarisé par clivage au niveau d'un site de restriction situé à l'extérieur du site d'insertion.

25                   Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, le premier et/ou le second gène de sélection est un gène de résistance à un antibiotique, par exemple un gène de résistance à l'ampicilline ou à la kanamycine.

30                   Selon encore un autre mode de réalisation de l'invention, le second gène de sélection est entouré de 2 sites de restriction, identiques ou différents, absents dans le génome de l'adénovirus utilisé à l'étape α) ; un tel gène de sélection peut ainsi être excisé de la séquence du génome de l'adénovirus recombinant par digestion au niveau de ces sites.

35                   Avantageusement, le procédé conforme à l'invention comprend, après la préparation du génome recombinant selon les étapes α) à γ) ci-dessus, une étape additionnelle de transfection du génome recombinant dans une lignée cellulaire appropriée permettant l'amplification dudit

génomique et son encapsidation dans des particules virales infectieuses.

Pour préparer des adénovirus recombinants conformes à l'invention, on peut utiliser des lignées cellulaires connues en elles-mêmes de l'homme de l'art (cf. par exemple GRAHAM et PREVEC, précité), exprimant la région E1 de l'adénovirus, et éventuellement la région E4 de l'adénovirus, lorsque cette dernière a été altérée par insertion d'une séquence hétérologue d'intérêt. Parmi les lignées utilisables, on peut citer notamment des lignées humaines telles que la lignée 293 (GRAHAM et al., J. Gen. Virol., 36, 59-74, 1977) et des lignées canines telle que la lignée DK/E1-28 (KLONJKOWSKI et al., Human Gene Therapy, précité). Avantageusement, on pourra utiliser une nouvelle lignée construite par les Inventeurs, qui est modifiée par l'insertion d'un fragment constitué par la séquence correspondant à celle qui s'étend des positions 439 à 3595 du génome de l'adénovirus canin de type 2 (GenBank J04368) ; une telle lignée ne comprend pas les séquences situées en amont de la position 439, qui sont présentes dans les lignées de l'art antérieur mentionnées ci-dessus.

De manière préférée, ladite lignée cellulaire est d'origine canine.

L'invention a en outre pour objet des plasmides et des molécules d'acide nucléiques utilisables pour la préparation du génome d'un adénovirus recombinant conforme à l'invention, notamment un adénovirus canin, ainsi que lesdits génomes recombinants, susceptibles d'être obtenus par les procédés tels que définis ci-dessus.

L'invention a en particulier pour objet les molécules d'acide nucléique et les plasmides suivants :

- toute molécule d'acide nucléique sélectionnée dans le groupe constitué par :

a) une molécule d'acide nucléique représentant le génome d'un adénovirus recombinant conforme à l'invention tel que défini ci-dessus ;

b) une molécule d'acide nucléique constituée par un fragment de la molécule a) ci-dessus, comprenant entre 10

et 1000 pb, de préférence au moins 300 pb, de la séquence de l'adénovirus réplcatif d'origine située en amont de la portion délétée et entre 10 et 5000 pb, de préférence entre 10 et 1000 pb, de manière préférée au moins 300 pb, de la séquence de l'adénovirus réplcatif d'origine située en aval de la portion délétée ; une telle molécule peut comprendre en outre tout ou partie d'une séquence hétérologue insérée en lieu et place de la portion délétée ou à proximité de celle-ci.

10                   - tout vecteur d'acide nucléique, notamment tout plasmide, contenant une molécule d'acide nucléique a) ou b) telle que définie ci-dessus.

                  L'invention a en outre pour objet les adénovirus recombinants conformes à l'invention pour une utilisation  
15   comme médicament.

                  L'invention a notamment pour objet l'utilisation des adénovirus conformes à l'invention, pour la préparation de compositions immunogènes ou vaccinales, ou de médicaments destinés à la thérapie génique ou au traitement du cancer,  
20   ainsi que pour la production de protéines recombinantes.

                  De manière préférée, ledit médicament ou ladite composition sont destinés à être administrés chez un carnivore domestique ou sauvage, notamment le chat, le chien ou le renard, ou bien chez l'Homme.

25                   Les adénovirus recombinants conformes à l'invention sont particulièrement bien adaptés aux utilisations thérapeutiques, par exemple vaccinales, chez l'homme et l'animal. En effet, contrairement aux adénovirus recombinants non-réplcatifs dont le génome est présent en  
30   faible nombre de copies par cellule et rapidement éliminé dans les cellules en division active, les adénovirus recombinants conformes à l'invention, réplcatifs ou pseudoréplcatifs, se multiplient de façon importante dans le noyau des cellules transduites permettant de transduire  
35   efficacement aussi bien des cellules quiescentes que des cellules en division active comme les cellules tumorales. En outre, les adénovirus pseudo-réplcatifs conformes à l'invention qui ne produisent aucune particule infectieuse

présentent une grande biosécurité et permettent en outre d'induire une forte réponse immune lors d'injections de rappel.

Des adénovirus recombinants conformes à l'invention, par exemple ceux dérivés de l'adénovirus canin, ont des applications pour la vaccination et le traitement du cancer chez les carnivores domestiques ou sauvages, notamment le chat, le chien ou le renard. En outre, du fait d'un tropisme d'hôte propre, ces adénovirus canins peuvent être utilisés en thérapie génique humaine, pour cibler des tissus différents de ceux qui peuvent être transduits par les vecteurs humains, par exemple des cellules du système nerveux central.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de Description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs illustrant la construction et la préparation d'un adénovirus recombinant conforme à l'invention, et son utilisation pour l'expression de gènes d'intérêt, notamment pour la vaccination.

#### **EXEMPLE 1: CONSTRUCTION DES ADENOVIRUS CAV 311-319, CAV 311-439 ET CAV 311-401**

##### **1) Construction des plasmides recombinants**

Les plasmides suivants ont été construits en utilisant les protocoles classiques de préparation, de clonage et d'analyse de l'ADN tels que ceux décrits dans *Current Protocols in Molecular Biology* (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA)

##### **a) Plasmide pCav2 contenant la séquence complète du génome de l'adénovirus canin de type 2 (Cav2)**

Ce plasmide est construit par recombinaison homologue dans *E. coli*, de manière analogue au procédé de préparation d'adénovirus humains, décrit dans CHARTIER et al., précité.

Les principales étapes de construction de ce plasmide sont présentées à la Figure 1.

De manière plus précise, les extrémités gauche et droite du génome de la souche Manhattan de Cav2 correspondant

aux séquences des positions 1 à 1060 (fragment A) et 29323-31323 (fragment B) sont amplifiées séparément par PCR à partir de l'ADN génomique de la souche Manhattan de Cav2 (APPEL et al., Am. J. Vet. Res., 34, 543-550, 1973), à l'aide des amorces suivantes :

Fragment A

5'-TTGGCGCGCCCATCATCAATAATATACAGGAC-3' (SEQ ID NO: 1)

5'-GCTCTAGACCTGCCCAAACATTTAACC-3' (SEQ ID NO: 2)

Fragment B

10 5'-TTGGCGCGCCCATCATCAATAATATACAGGAC-3' (SEQ ID NO: 1)

5'-GCTCTAGAGGGTGATTATTAACAACGTC-3' (SEQ ID NO: 3)

Les fragments A et B obtenus sont clonés séparément dans le plasmide pCR2.1 (TA Cloning System, INVITROGEN) pour donner respectivement les plasmides pCR2.1/ITR gauche et pCR2.1/ITR droit. Le plasmide pCR2.1/ITR gauche est digéré par BamHI et XbaI et le fragment de 1111 pb ainsi généré est cloné entre les sites BamHI et XbaI du plasmide pPolyII *Amp<sup>R</sup>* (GenBank M18128, LATHE et al., Gene, 57, 193-201, 1987) pour donner le plasmide dénommé pPolyII/ITR gauche. Le plasmide pCR2.1/ITR droit est clivé par BamHI, traité par la polymérase de Klenow, puis clivé par XbaI ; le fragment de 2052 pb ainsi généré est cloné entre les sites XbaI et PvuII du plasmide pPolyII/ITR gauche pour donner le plasmide pPolyII.ITRs.Cav2. Ce plasmide contient les extrémités gauche et droite du génome de la souche Manhattan de Cav2 clonées sous forme d'un fragment *AscI-AscI* de 3073 pb comprenant un site *XbaI* en position 1066 dudit fragment, permettant de linéariser le plasmide au niveau du site d'insertion de l'ADN.

30 L'ADN génomique de la souche Manhattan de Cav2 et l'ADN de pPolyII.ITRs.Cav2 linéarisé au site *XbaI* sont co-transformés dans la souche d'*E. coli* BJ5183 *recBC sbcBC* (HANAHAN et al., J. Mol. Biol., 166, 557-580, 1983). Un plasmide recombinant de 33425 pb, dénommé pCav2, est isolé à partir des colonies résistantes à l'ampicilline.

Le plasmide pCav2 contient le génome complet de Cav2 (souche Manhattan) cloné sous forme d'un fragment de 31331 pb flanqué de deux sites *AscI* qui sont uniques dans ce

plasmide, ces sites étant absents dans le génome de Cav2 (souches Manhattan et Toronto) ainsi que dans celui de la souche d'adénovirus ovin OAV.

**b) Plasmides navettes**

5 b<sub>1</sub>) pNavette/311-439.CMVeGFP

Ce plasmide de 6111 pb dérive du plasmide pBluescript KS (STRATAGENE) par insertion des séquences de Cav2 en amont et en aval de la délétion 312-438 (UpRecSeq 1-311 et DownRecSeq 439-1060), de part et d'autre d'une  
10 cassette d'expression du gène rapporteur GFP.

Ce plasmide est construit selon les étapes suivantes :

1°) un fragment C correspondant à la séquence des positions 1 à 311 (UpRecSeq) de Cav2, est amplifié par PCR à  
15 l'aide des amorces :

5'-TTGGCGCCCATCATCAATAATATACAGGAC-3' (SEQ ID NO: 1)

5'-CCGACGTCGACCATAAACTTTGACATTAGCCG-3' (SEQ ID NO: 4).

Le produit d'amplification PCR est cloné dans le plasmide pCR2.1 pour donner le plasmide pCR2.1/UpRecSeq (1-  
20 311).

2°) un fragment D correspondant à la séquence des positions 439 à 1060 (DownRecSeq) de Cav2, est amplifié par PCR à l'aide des amorces :

5'-GCTCTAGAGCGAAGATCTCCAACAGCAATACACTCTTG-3' (SEQ ID NO: 5)

25 5'-GCTCTAGACCTGCCCAAACATTTAACC-3' (SEQ ID NO: 2).

Le produit d'amplification PCR est cloné dans le plasmide pCR2.1 pour donner le plasmide pCR2.1/DownRecSeq (439-1060).

3°) un fragment E d'environ 2050 pb contenant le  
30 promoteur précoce du cytomégalo virus, un intron, la séquence codante de l'eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) et un signal de polyadénylation, est obtenu selon les étapes suivantes :

Le plasmide pEGFP-1 (CLONTECH) est clivé par  
35 BamHI, traité avec la polymérase de Klenow puis digéré par NotI ; le fragment de 741 pb ainsi obtenu est cloné entre les sites XhoI (préablement réparé par traitement avec la



polymérase de Klenow) et NotI du plasmide pCI (PROMEGA), pour donner le plasmide pCMVeGFP.

Le plasmide pCMVeGFP est ensuite clivé par BglII, traité avec la polymérase de Klenow puis digéré par BamHI  
5 pour générer un fragment de 2050 pb (fragment E).

4°) Le fragment E est inséré entre les sites SmaI et BamHI du plasmide pBLUESCRIPT KS pour donner le plasmide pKS/CMVeGFP. Le plasmide pCR2.1/UpRecSeq(1-311) est clivé par KpnI et SalI et le fragment de 371 pb ainsi obtenu (fragment  
10 C) est cloné entre les sites KpnI et SalI du plasmide pKS/CMVeGFP, pour donner le plasmide pKS/CMVeGFP-C. Le plasmide pCR2.1/DownRecSeq(439-1060) est clivé par XbaI et le fragment de 650 pb ainsi obtenu (fragment D) est inséré au site XbaI du plasmide pKS/CMVeGFP-C, pour donner le plasmide  
15 dénommé pNavette 311-439/CMVeGFP.

#### b<sub>2</sub>) pNavette 311-401/CMVeGFP

Le plasmide navette pNavette 311-401/CMVeGFP est construit à partir du plasmide pNavette 311-439/CMVeGFP, selon les étapes suivantes :

20 La séquence 401-1060(DownRecSeq) est amplifiée par PCR à l'aide des amorces :

5'-GATAAGGATCACGCGGCCTTAAATTCTCAG-3' (SEQ ID NO: 6)

5'-GCTCTAGACCTGCCCAAACATTTAACC-3' (SEQ ID NO: 2).

Le produit d'amplification PCR est cloné dans le  
25 plasmide pCR2.1 pour donner le plasmide pCR2.1/DownRecSeq(401-1060).

Ce plasmide pCR2.1/DownRecSeq(401-1060) est digéré par EcoRI puis traité par la polymérase de Klenow et le fragment 401-1060 ainsi obtenu est substitué au fragment  
30 439-1060 du plasmide pNavette 311-439/CMVeGFP préalablement digéré par XbaI puis traité par la polymérase de Klenow, pour donner le plasmide pNavette 311-401/CMVeGFP.

#### B<sub>3</sub>) pNavette 311-319/CMVeGFP

Le plasmide navette pNavette 311-319/CMVeGFP est  
35 construit à partir du plasmide pNavette 311-439/CMVeGFP, selon les étapes suivantes :

La séquence 319-1060(DownRecSeq) est amplifiée par PCR à l'aide des amorces :

5'-GATAAGGATCAACAGAAACACTCTGTTCTCTG-3' (SEQ ID NO: 7)

5'-GCTCTAGACCTGCCCAAACATTTAACC-3' (SEQ ID NO: 2).

5 Le produit d'amplification PCR est cloné dans le plasmide pCR2.1 pour donner le plasmide pCR2.1/DownRecSeq(319-1060).

10 Ce plasmide pCR2.1/DownRecSeq(319-1060) est digéré par EcoRI puis traité par la polymérase de Klenow et le fragment 319-1060 ainsi obtenu est substitué au fragment 439-1060 du plasmide pNavette 311-439/CMVeGFP préalablement digéré par XbaI puis traité par la polymérase de Klenow, pour donner le plasmide pNavette 311-319/CMVeGFP.

b<sub>4</sub>) Plasmide navette pNavette 311-439/CMVeGFP/Kana

15 Ce plasmide de 7027 pb dérivé du plasmide pNavette 311-439/CMVeGFP par clonage au site *PmeI* d'une cassette d'expression d'un gène de résistance à la kanamycine en orientation opposée à celle de la cassette de la GFP, est obtenu selon les étapes suivantes :

20 La phase codante du gène Kana est amplifiée par PCR à partir du plasmide pET-29a(+) (NOVAGEN) à l'aide des amorces :

5'-AGCTTTGTTTAAACGGCGCGCCGGGATTTTGGTCATGAAC-3' (SEQ ID NO: 8)

5'-CCGGCGCGCCGTTTAAACAAAGCTATCCGCTCATGAA-3' (SEQ ID NO: 9).

25 Le produit d'amplification PCR est cloné dans le plasmide pCR2.1 pour donner le plasmide pCR2.1-Kana/*PmeI*. Le plasmide pCR2.1-Kana/*PmeI* est clivé par EcoRI, traité par la polymérase de Klenow et le fragment d'environ 959 pb contenant la phase codante du gène Kana est inséré au site EcoRV du plasmide pNavette 311-439/CMVeGFP pour donner le plasmide pNavette 311-439/CMVeGFP/Kana.

30 Ce plasmide pNavette 311-439/CMVeGFP/Kana représenté à la Figure 2, qui contient un gène de résistance à un antibiotique, cloné entre les séquences adénovirales cibles de la recombinaison, en amont de la séquence hétérologue à insérer, permet avantageusement de sélectionner les recombinants qui sont résistants à la fois à

l'ampicilline et à la kanamycine. En outre, le gène Kana qui est ensuite excisé du plasmide recombinant par digestion au niveau des 2 sites *PmeI*, est absent de la séquence de l'adénovirus recombinant généré à partir de ce plasmide.

5 b<sub>4</sub>) Plasmide navette pPoly II 311-439/CMVeGFP/Kana (Figure 2)

Ce plasmide de 6332 pb est obtenu par clonage entre les sites KpnI (position 42) et PvuII (position 63) du plasmide pPoly II, du fragment KpnI- PvuII de 4292 pb du pNavette 311-439/CMVeGFP, comme illustré à la Figure 2.

10 **c) Plasmide pCav 311-439/CMVeGFP**

Ce plasmide est obtenu par recombinaison homologue dans la souche d'*E. coli* BJ5183 selon les 2 alternatives c1 et c2 suivantes, illustrées respectivement par les Figures 3 et 4 :

15 c<sub>1</sub>) recombinaison de pNavette 311-439/CMVeGFP.Kana avec le plasmide pCav2 sous forme circulaire (Figure 3)

1) la molécule donneuse contenant les séquences de recombinaison amont (UpRecSeq 1-311) et aval (DownRecSeq 439-1060) et les cassettes CMVeGFP et Kana est préparée à  
20 partir du plasmide pNavette 311-439/CMVeGFP.Kana par digestion avec les enzymes de restriction KpnI et EcoRV,

2) le fragment obtenu en 1) et le plasmide pCav2 (Amp<sup>R</sup>) sous forme circulaire sont co-transformés dans la souche d'*E. coli* BJ5183, et

25 3) les plasmides recombinants sont isolés sur le critère de la double résistance à l'ampicilline et à la kanamycine. La séquence de l'un d'entre eux, pCav 311-439/CMVeGFP.Kana est confirmée par restriction enzymatique et par séquençage.

30 4) la cassette Kana est ensuite excisée par digestion avec l'enzyme de restriction *PmeI*, de façon à obtenir le plasmide pCav 311-439/CMVeGFP contenant le génome de Cav2 délété de la séquence 312-438 qui est substituée par une cassette d'expression de la GFP.

c<sub>2</sub>) recombinaison de pPolyII 311-439/CMVeGFP.Kana avec le plasmide pCav2 préalablement linéarisé en dehors du site d'insertion (Figure 4).

1) la molécule donneuse est préparée à partir du  
5 plasmide pPolyII 311-439/CMVeGFP.Kana par digestion avec l'enzyme de restriction *Swa I*,

2) le plasmide pCav2 est linéarisé par clivage au site *PvuI*,

3) le fragment obtenu en 1) et le plasmide pCav2  
10 linéarisé obtenu en 2') sont co-transformés dans la souche d'*E. coli* BJ5183, et

4) les plasmides recombinants sont isolés sur le critère de la double résistance à l'ampicilline et à la kanamycine. La séquence de l'un d'entre eux, pCav 311-  
15 439/CMVeGFP.Kana est confirmée par restriction enzymatique et par séquençage.

5) la cassette Kana est ensuite excisée par digestion avec l'enzyme de restriction *PmeI*, de façon à obtenir le plasmide pCav 311-439/CMVeGFP contenant le génome  
20 de Cav2 délété de la séquence des positions 312-438 qui est substituée par une cassette d'expression de la GFP.

**d) Plasmide pCav 311-401/CMVeGFP**

Le plasmide pNavette 311-401/CMVeGFP est digéré par *KpnI* et *SwaI* et le fragment de 3167 pb ainsi obtenu et le  
25 plasmide pCav 311-439 CMVeGFP linéarisé au site *PmeI* sont co-transformés dans la souche d'*E. coli* BJ5185. Le plasmide recombinant pCav 311-401 CMVeGFP généré par recombinaison homologue, est sélectionné sur le critère de la double résistance à l'ampicilline et à la kanamycine.

**30 d) Plasmide pCav 311-319/CMVeGFP**

Le plasmide pNavette 311-319/CMVeGFP est digéré par *KpnI* et *SwaI* et le fragment de 3249 pb ainsi obtenu et le  
35 plasmide pCav 311-439 CMVeGFP linéarisé au site *PmeI* sont co-transformés dans la souche d'*E. coli* BJ5185. Le plasmide recombinant pCav 311-319 CMVeGFP généré par recombinaison homologue, est sélectionné sur le critère de la double résistance à l'ampicilline et à la kanamycine.

## 2) Production des virus recombinants

Les plasmides pCav 311-439/CMVeGFP, pCav 311-401/CMVeGFP ou pCav 311-319/CMVeGFP sont digérés par l'enzyme de restriction *AscI* afin d'exciser les séquences du génome de l'adénovirus recombinant. Le génome adénoviral excisé est ensuite transfecté dans la lignée cellulaire canine DK/E1-28 qui exprime constitutivement la région E1 de Cav2 (KLONJKOWSKI et al., Human Gene Therapy, précité), en présence de Lipofectamine (GIBCO), selon les techniques usuelles, bien connues en elles mêmes de l'homme de l'art (cf. par exemple GRAHAM et PREVEC, précité). Lorsqu'un effet cytopathique est observé, le virus est récolté à partir des cellules transfectées, puis amplifié dans la même lignée cellulaire DK/E1-28 et purifié par centrifugation sur un gradient de chlorure de césium, selon un protocole classique, tel que décrit par exemple dans GRAHAM et PREVEC, précité.

La séquence génomique des virus Cav 311-439/CMVeGFP, Cav 311-401/CMVeGFP et Cav 311-319/CMVeGFP est confirmée par restriction enzymatique et par séquençage partiel de l'ADN viral extrait des cellules DK/E1-28 infectées, préparé selon la technique de HIRT (J. Mol. Biol., 26, 365-369, 1967). Les préparations de virus Cav recombinants sont titrées par dilution limite en plaque à 96 puits, selon la méthode de SPEARMAN et KÄRBER (Virology Methods Manual, Brian W J Mahy and Hillar O Kangro, 1996, Academic Press, Harcourt Brace & Company). Le titre en TCID<sub>50</sub>/ml obtenu par cette méthode est équivalent au titre en ufp/ml obtenu par la méthode des plages sur cellules DK, selon le protocole décrit dans KLONJKOWSKI et al., précité.

Les résultats obtenus sont les suivants :

- les virus Cav 311-439/CMVeGFP, Cav 311-401/CMVeGFP, Cav 311-319/CMVeGFP isolés présentent un profil de restriction et une séquence conformes à ceux attendus,
- les virus Cav 311-439/CMVeGFP, Cav 311-401/CMVeGFP et Cav 311-319/CMVeGFP purifiés présentent un titre d'environ 10<sup>9,2</sup> ufp/ml.

**EXEMPLE 2 : CARACTERISATION DU VIRUS RECOMBINANT CAV 311-439****1) Analyse de l'efficacité de transduction et de l'effet cytopathique de Cav 311-439 CMVeGFP dans les cellules félines et canines**

5 Des lignées de cellules canines (DK/E1-28 et DK) ou félines (CRFK) sont infectées par le virus Cav 311-439 CMVeGFP, à une multiplicité d'infection de 10 ufp/cellule. Des cellules non-infectées et des cellules infectées par le virus Cav de type sauvage (Cav2) sont utilisées comme témoin.

10 3 et 5 jours après l'infection, la présence d'un effet cytopathique (ECP) est analysée par observation des cellules infectées au microscope optique. En outre, l'expression du transgène dans les cellules infectées par le virus Cav 311-439 CMVeGFP est confirmée par détection de la

15 GFP en microscopie de fluorescence.

Les résultats de cette expérience sont présentés dans les Tableaux I et II ci-dessous :

TABLEAU I

Virus	DK	DK/E1-28	CRFK
Cav 311-439 CMVeGFP	-	++	-
Cav	+	++	-
Témoin	-	-	-

TABLEAU II

Cellules infectées par Cav 311-439.CMVeGFP	ECP	GFP
DK	-	+
DK/E1-28	++	+++

20 Ces résultats montrent que :

- un niveau d'expression élevé du transgène est observé dans les cellules infectées par le virus Cav 311-439 CMVeGFP, et
- aucun effet cytopathique n'est observé dans les
- 25 cellules canines non modifiées (cellules DK) ou félines infectées par ce virus Cav 311-439 CMVeGFP ; un effet cytopathique important est observé uniquement dans les cellules canines exprimant la région E1 infectées par ce virus Cav311-439 CMVeGFP,
- 30 - dans les contrôles, un effet cytopathique important est observé dans les cellules canines (DK et DK/E1-28) infectées par le Cav de type sauvage (Cav2), et aucun

effet cytopathique n'est observé dans les cellules félines infectées par le Cav2.

Les résultats de ces expériences montrent que les virus Cav 311-439 sont capables de transduire très efficacement les cellules sans induire d'effet cytopathique dans les cellules canines qui sont permissives à la réplication des adénovirus canins de type sauvage, ainsi que dans les cellules félines.

10 **2) Analyse de la réplication de Cav 311-439 CMVeGFP dans les cellules félines et canines**

Des lignées de cellules canines (DK/E1-28 et DK) ou félines (CRFK) sont infectées par le virus Cav 311-439 CMVeGFP, à une multiplicité d'infection de 10 ufp/cellule. Des cellules non-infectées et des cellules infectées par le virus Cav de type sauvage sont utilisées comme témoins.

2, 24, 48 et 72 heures après l'infection, les cellules sont récoltées et centrifugées. L'ADN viral intracellulaire est préparé selon la technique de HIRT (J. Mol. Biol., 26, 365-369, 1967), digéré par l'enzyme *EcoRI*, puis visualisé sur gel d'agarose après migration électrophorétique.

Les résultats sont présentés à la Figure 5 :

Légende de la Figure 5 : l'ADN viral extrait de cellules félines (CRFK) ou canines (DK, DK/E1-28) à différents temps après l'infection (2, 24, 48 et 72 heures) par l'adénovirus Cav 311-439.CMVeGFP est digéré par *EcoRI* et analysé en gel d'agarose. La lignée DK/E1-28 qui exprime la région E1 de l'adénovirus est utilisée comme témoin positif de la réplication.

30 Ces résultats montrent que :

- le virus Cav 311-439 CMVeGFP réplique son génome dans les lignées canines et félines testées,
- le niveau de réplication est plus important dans les cellules canines que dans les cellules félines,
- 35 - le pic de réplication est atteint à 24 heures dans les cellules DK/E1-28 et à 48 heures dans les cellules

DK, vraisemblablement en raison de l'expression cellulaire de la région E1 dans les cellules DK/E1-28.

Par comparaison, dans les cellules témoins infectées par le virus Cav de type sauvage, on observe une  
5 quantité similaire d'ADN génomique dans les 3 lignées cellulaires.

Les résultats de cette expérience démontrent que la délétion 311-439 n'affecte pas la réplication de l'adénovirus canin: les vecteurs portant cette délétion (Cav  
10 311-439 CMVeGFP) se comportent comme les adénovirus sauvages en ce qui concerne la réplication de leur génome dans des cellules canines ou félines.

### **3) Analyse de la production de particules virales dans les cellules canines infectées par le virus Cav 311-439.CMVeGFP**

15 Des lignées de cellules canines DK sont infectées par le vecteur Cav 311-439 CMVeGFP, à une multiplicité d'infection de respectivement 0,1, 1 et 10 ufp/cellule. Des cellules non-infectées et des cellules infectées par le virus Cav de type sauvage sont utilisées comme témoin.

20 Les cellules infectées sont récoltées 2 heures et 6 jours après l'infection, lysées par plusieurs cycles de congélation et de décongélation. Le lysat cellulaire est titré par la technique des dilutions limites précitée.

La quantité de virus présente dans les cellules,  
25 exprimée en ufp/ml, est présentée dans le Tableau III ci-dessous.

TABLEAU III

virus	Temps	0,1 ufp/cellule	1 ufp/cellule	10 ufp/cellule
Cav 311-439	J0	$< 10^{1,8}$	$10^{2,4}$	$10^3$
	J6	$< 10^{1,8}$	$10^3$	$10^{2,8}$
Cav	J0	$10^2$	$10^3$	$10^{4,4}$
	J6	$10^{7,6}$	$10^{6,8}$	$10^{6,8}$

Ces résultats montrent que le virus Cav 311-439 ne produit pas de particules virales infectieuses dans les  
30 cellules canines n'exprimant pas la région E1 comme les



cellules DK : le cycle viral de Cav 311-439 est abortif dans les cellules canines.

**4) Vaccination de chats conventionnels avec le virus Cav 311-439**

5 Des groupes de chats sont inoculés par voie intramusculaire avec les doses suivantes de Cav 311-439 :

groupe 1 (n=2) :  $9,6 \times 10^7$  pfu

groupe 2 (n=2) :  $9,6 \times 10^6$  pfu

groupe 3 (n =2 ) : témoin.

10 A J14, J21 et J31, les anticorps sériques anti-eGFP sont titrés par ELISA.

Les résultats sont présentés à la Figure 6.

Légende de la Figure 6 : Titres en anticorps sériques anti-eGFP (Ac) chez le chat, aux jours J7, J14, J21 et J31 après l'inoculation de différentes doses du virus Cav 311-439. CMVeGFP: -■-  $9,6 \times 10^7$  ufp/ml (ufp: unités formant  
15 et J31 après l'inoculation de différentes doses du virus Cav 311-439. CMVeGFP: -■-  $9,6 \times 10^7$  ufp/ml, -▲-  $9,6 \times 10^7$  ufp/ml, ...□...  $9,6 \times 10^6$  ufp/ml, ...○...  $9,6 \times 10^6$  ufp/ml.

Ces résultats montrent qu'une seule injection de  
20 Cav 311-439 permet d'induire chez le chat une réponse immune (humorale) spécifique du gène d'intérêt.

**EXEMPLE 3: CONSTRUCTION D'UNE LIGNEE D'ORIGINE CANINE EXPRIMANT CONSTITUTIVEMENT LA REGION E1 DE CAV2.**

Une nouvelle lignée exprimant la région E1 est  
25 construite à partir de la lignée DK (lignée immortalisée de cellules de rein de chien; ATCC CRL 6247) en suivant les étapes suivantes :

La séquence des positions 439 à 3595 de Cav2 (souche Manhattan) est amplifiée par PCR à l'aide des amorces  
30 suivantes:

5'-CGGCCGACTCTTGAGTGCGCAGCGAGA-3' (SEQ ID NO: 10)

5'-GGCGCGCCGAGAGACAACGCTGGACACGG-3' (SEQ ID NO: 11)

Le produit d'amplification PCR est cloné dans le plasmide pCR2.1 pour donner le plasmide pCR2.1/E1.

35 Le plasmide pTRE (CLONTECH) est digéré par BamHI, traité par la polymérase de Klenow et recircularisé pour donner le plasmide pTRE/dl BamHI.

Le plasmide pCR2.1/E1 est digéré par EcoRI, le fragment de 3187 pb ainsi obtenu est cloné au site EcoRI du plasmide pTRE/dl BamHI pour donner le plasmide pTRE E1 Cav2.

Ce plasmide pTRE E1 Cav2 contient la séquence  
5 codante de la protéine E1A sous le contrôle d'un promoteur CMV minimum et d'éléments de réponse de l'opéron Tet (*Tet-Responsive Element* ou TRE), les séquences codantes des protéines E1B (133R et 438R ; SHIBATA et al., Virology, 172, 460-467, 1989) sous le contrôle de leur propre promoteur et  
10 les propre signaux de polyadénylation de ces séquences.

A partir du pTRE E1 Cav2, une lignée exprimant la région E1 est obtenue de manière analogue à la lignée DK/E1-28 (KLONJKOWSKI et al., précité).

De manière plus précise, les cellules DK sont co-  
15 transfectées à l'aide du plasmide pTRE E1 Cav2 linéarisé au site AatII et du plasmide pTK-Hyg (CLONTECH) linéarisé au site AseI. Des clones sont sélectionnés en présence d'hygromycine (150 µg/ml) puis analysés par Southern blot, Northern blot, RT-PCR et Western blot. 4 clones exprimant la  
20 région E1 (E1A et E1B), capables de produire efficacement les vecteurs délétés selon l'invention ont été isolés.

#### **EXEMPLE 4 : IMMUNISATION DE SOURIS AVEC LE VIRUS CAV 311-319**

Des souris réparties en trois groupes ont été  
inoculées par voie intramusculaire avec la dose de  $10^8$  pfu  
25 des virus suivants :

Groupe 1 (n=4) : Cav 311-319 eGFP

Groupe 2 (n=4) : Cav 311-319 CONTROL

Groupe 3 (n=1) : témoin non inoculé.

Le virus Cav 311-319 CONTROL est isogénique au  
30 virus Cav 311-319 eGFP à l'exception du gène hétérologue inséré (à la place du gène codant pour la GFP est inséré un gène hétérologue codant pour une protéine ne présentant pas de parenté antigénique avec la GFP).

A J7, les anticorps sériques anti eGFP produits  
35 par les souris inoculées ont été titrés par Elisa.

Les résultats sont présentés à la figure 7.

Légende de la figure 7 : DO à 405 nm aux différentes dilutions (de 1 à 8, respectivement 1/5, 1/15, 1/45, 1/135, 1/405, 1/1215, 1/3645 et 1/10935) des sérums de souris des groupes : eGFP (◆), CONTROL (■) et témoin (▲).

- 5 Ces résultats montrent qu'une seule injection de Cav 311-319 permet d'induire chez la souris une réponse immune (humorale) spécifique du gène hétérologue inséré dans cet adénovirus.

## REVENDEICATIONS

1) Adénovirus recombinant susceptible d'être obtenu à partir d'un adénovirus répliatif par délétion de tout ou partie de la région du génome dudit adénovirus répliatif correspondant à celle située, dans le génome de l'adénovirus canin de type 2 (GenBank J04368), entre les positions 311 et 499, ladite délétion comprenant tout ou partie de la région du génome de l'adénovirus répliatif d'origine correspondant à celle située entre les positions 311 et 401 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2.

2) Adénovirus recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce que la portion délétée est constituée par tout ou partie de la région du génome de l'adénovirus répliatif d'origine correspondant à celle située entre les positions 311 et 319 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2.

3) Adénovirus recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce que la portion délétée comprend tout ou partie de la région du génome de l'adénovirus répliatif d'origine correspondant à celle située entre les positions 318 et 401 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2.

4) Adénovirus recombinant, selon la revendication 3, caractérisé en ce que la portion délétée comprend en outre :

- tout ou partie de la région du génome de l'adénovirus répliatif d'origine correspondant à celle située entre les positions 311 et 319 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2 ; et/ou

- tout ou partie de la région du génome de l'adénovirus répliatif d'origine correspondant à celle située entre les positions 400 et 439 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2 ; et/ou

- tout ou partie de la région du génome de l'adénovirus répliatif d'origine correspondant à celle située entre les positions 438 et 499 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2.

5) Adénovirus recombinant selon une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une séquence hétérologue d'intérêt insérée dans son génome.

5                   6) Adénovirus recombinant selon la revendication 5, caractérisé en ce que ladite séquence hétérologue est insérée dans la région du génome correspondant à celle située entre les positions 311 et 319 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2.

10                   7) Adénovirus recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il est issu d'un adénovirus canin de type 2.

8) Molécule d'acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par :

15                   a) une molécule d'acide nucléique représentant le génome d'un adénovirus recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, et

                  b) une molécule d'acide nucléique constituée par un fragment de la molécule a) ci-dessus, comprenant entre 10 et 1000 pb, de préférence au moins 300 pb, de la séquence de l'adénovirus répliquatif d'origine située en amont de la portion délétée et entre 10 et 5000 pb, de préférence entre 10 et 1000 pb, de manière préférée au moins 300 pb, de la séquence de l'adénovirus répliquatif d'origine située en aval de la portion délétée.

9) Plasmide, caractérisé en ce qu'il comprend une molécule d'acide nucléique selon la revendication 8.

10) Adénovirus recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour une utilisation comme médicament.

11) Utilisation d'un adénovirus recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour la préparation d'un médicament destiné à la thérapie génique.

12) Utilisation d'un adénovirus recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du cancer.

13) Utilisation d'un adénovirus recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour la préparation d'une composition immunogène ou vaccinale.

14) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisée en ce que ledit médicament ou ladite composition sont destinés à être administrés chez un carnivore domestique ou sauvage.

15) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisée en ce que ledit médicament ou ladite composition sont destinés à être administrés chez l'homme.

16) Procédé de préparation d'un adénovirus recombinant par recombinaison intermoléculaire homologue dans une cellule procaryote, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

α) introduction dans ladite cellule procaryote : (i) d'un plasmide comprenant le génome d'un adénovirus et un premier gène de sélection ; et (ii) d'un fragment d'ADN préalablement linéarisé comprenant une séquence hétérologue flanquée de séquences homologues à celles flanquant le site dudit plasmide où doit s'effectuer l'insertion, et incluant un second gène de sélection, différent du premier,

β) culture de ladite cellule procaryote dans des conditions sélectives, afin de permettre la génération et la sélection de cellules contenant des plasmides recombinants exprimant le premier et le second gène de sélection, et

γ) isolement du génome dudit adénovirus recombinant à partir des cellules procaryotes sélectionnées.

17) Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que le plasmide utilisé à l'étape α) est sous forme circulaire.

18) Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que le plasmide utilisé à l'étape α) est préalablement linéarisé par clivage au niveau d'un site de restriction situé à l'extérieur du site d'insertion.

19) Procédé selon l'une quelconque des revendications 16 à 18, caractérisé en ce que ledit second gène de sélection est entouré de 2 sites de restriction,

identiques ou différents, absents dans le génome de l'adénovirus inclus dans le plasmide utilisé à l'étape  $\alpha$ ).

20) Procédé selon l'une quelconque des revendications 16 à 19, caractérisé en ce qu'il comprend une  
5 étape additionnelle de transfection dudit génome recombinant dans une lignée cellulaire permettant l'amplification dudit génomes et son encapsidation dans des particules virales infectieuses.

21°) Utilisation d'un adénovirus recombinant  
10 selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour la production de protéines recombinantes.

1/7

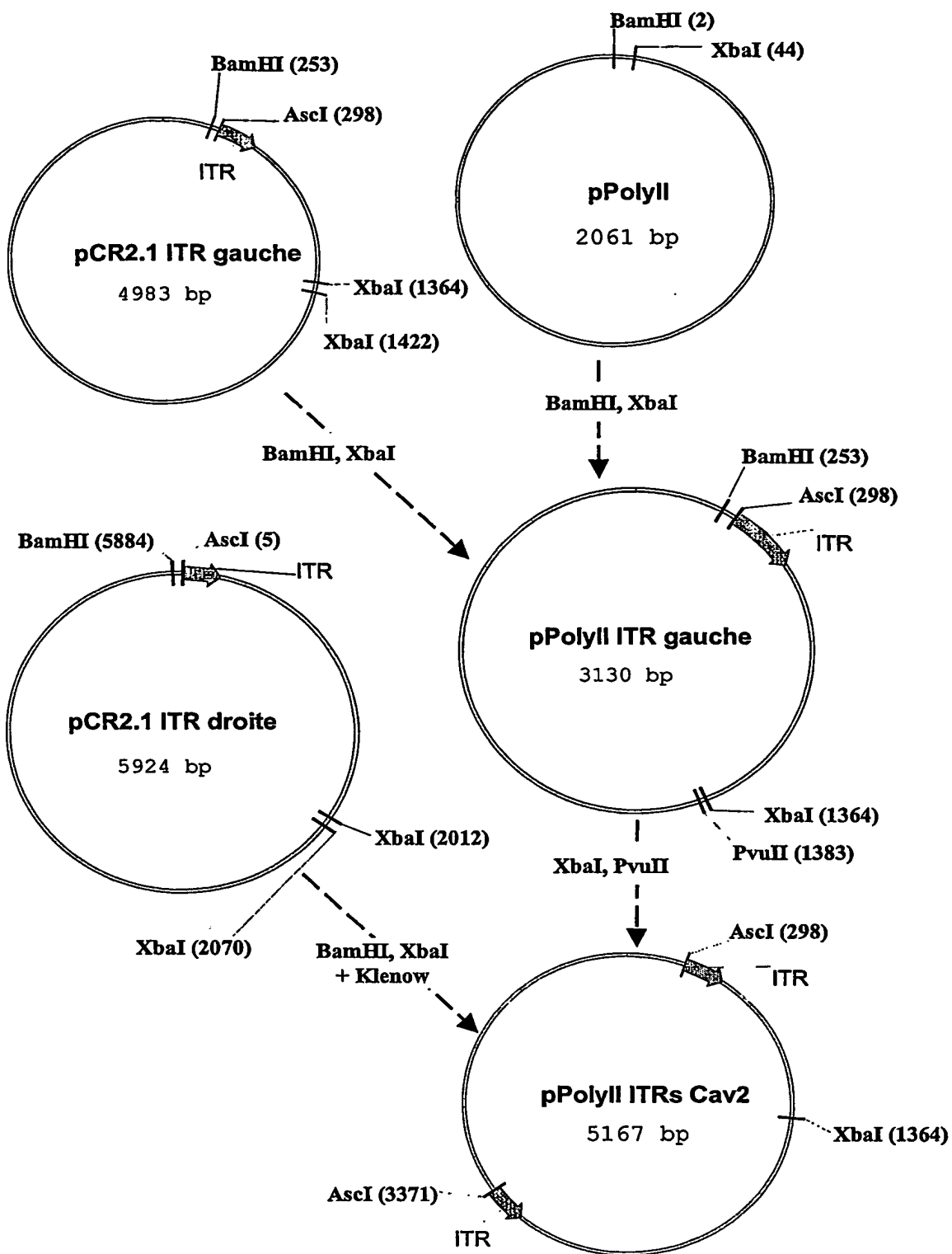


Figure 1



2/7

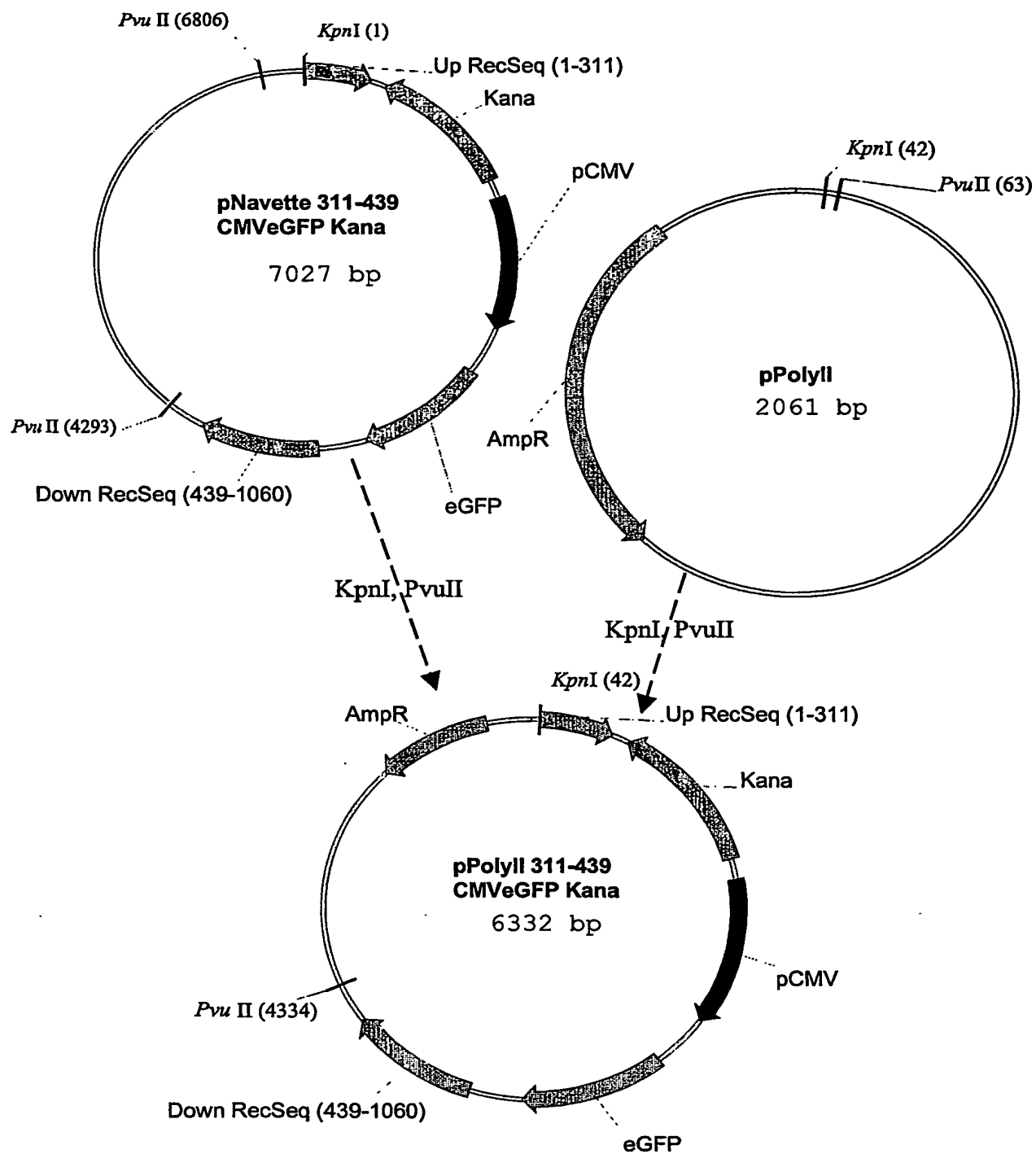


Figure 2

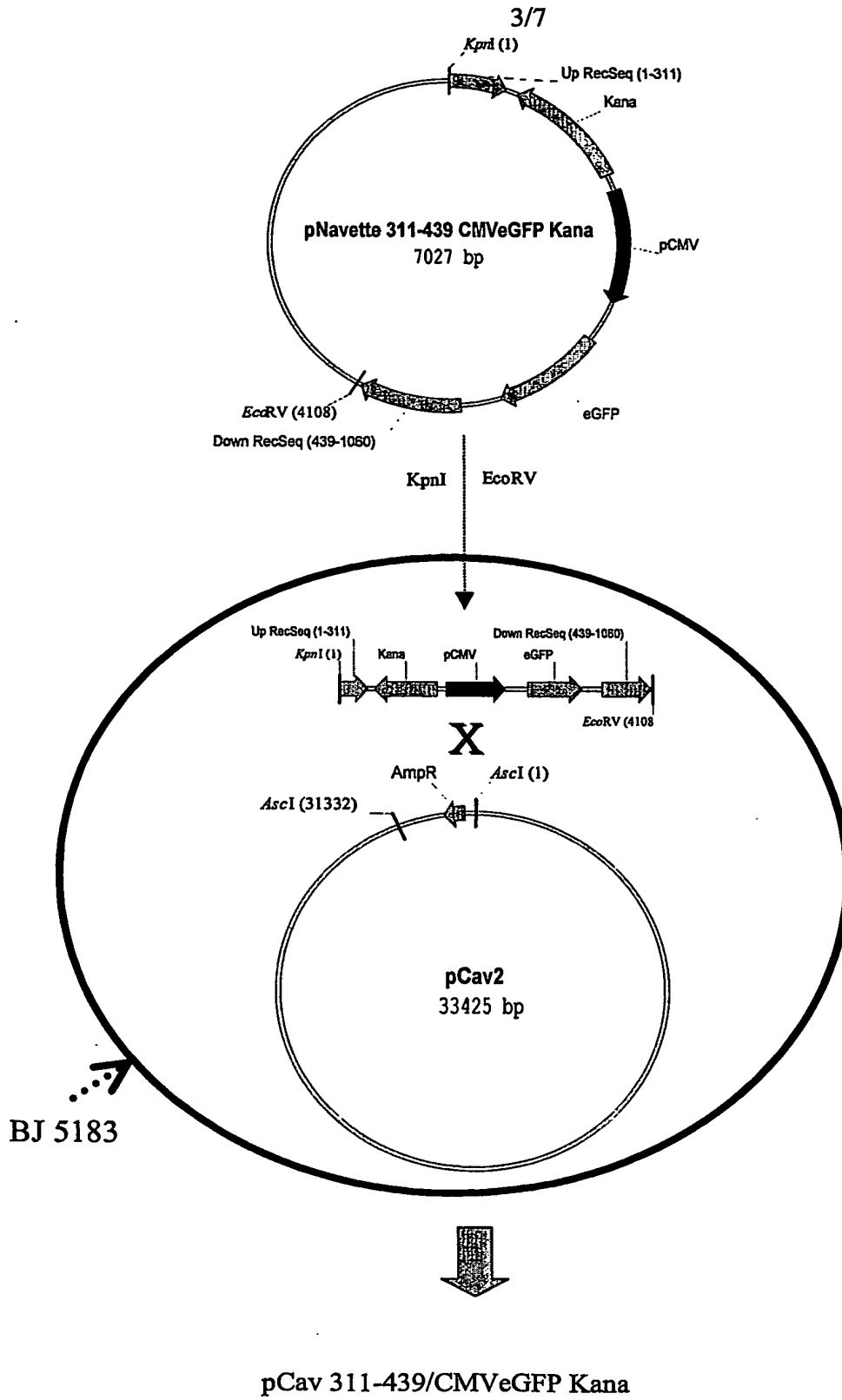


Figure 3

4/7

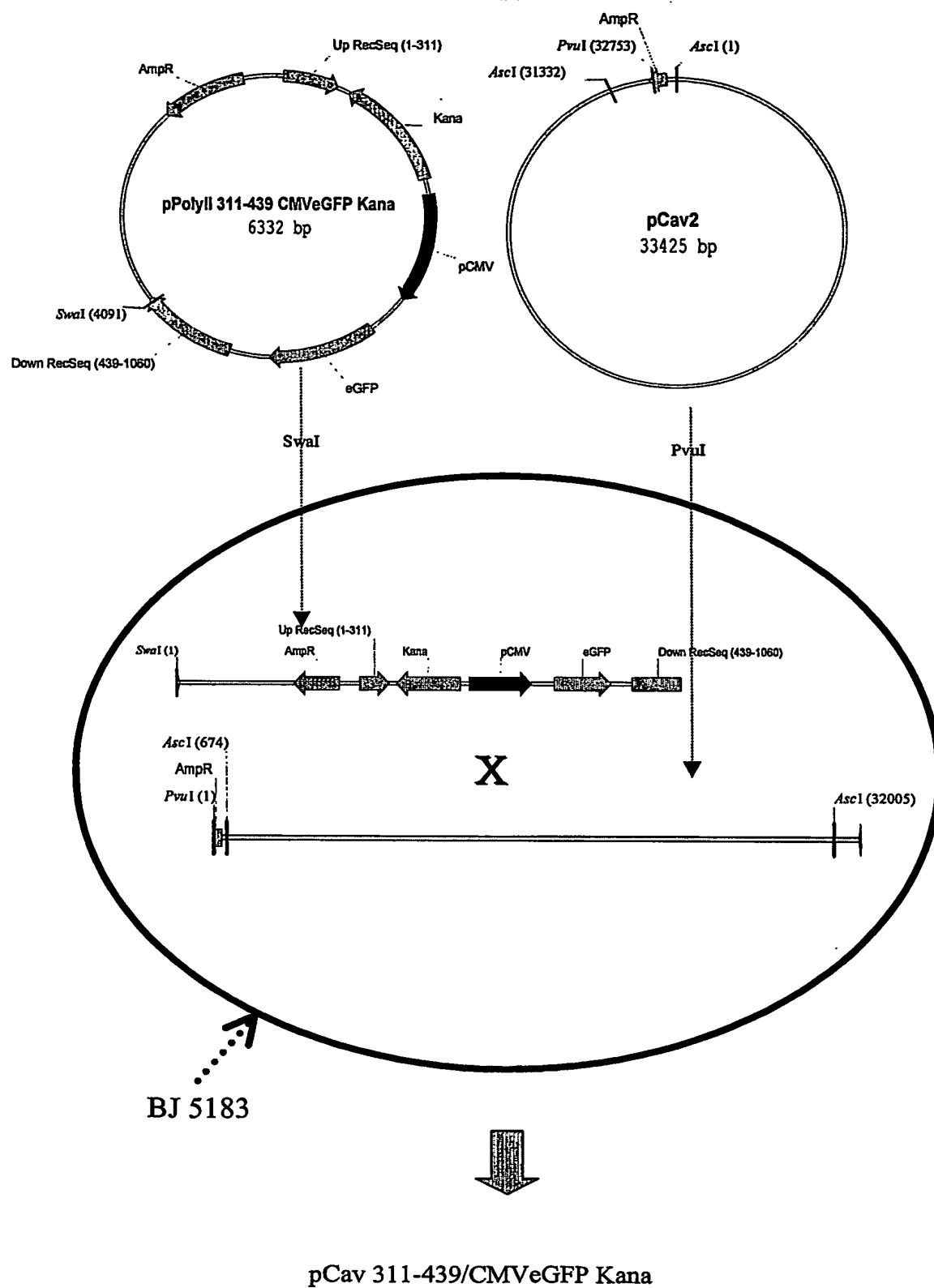


Figure 4

5/7

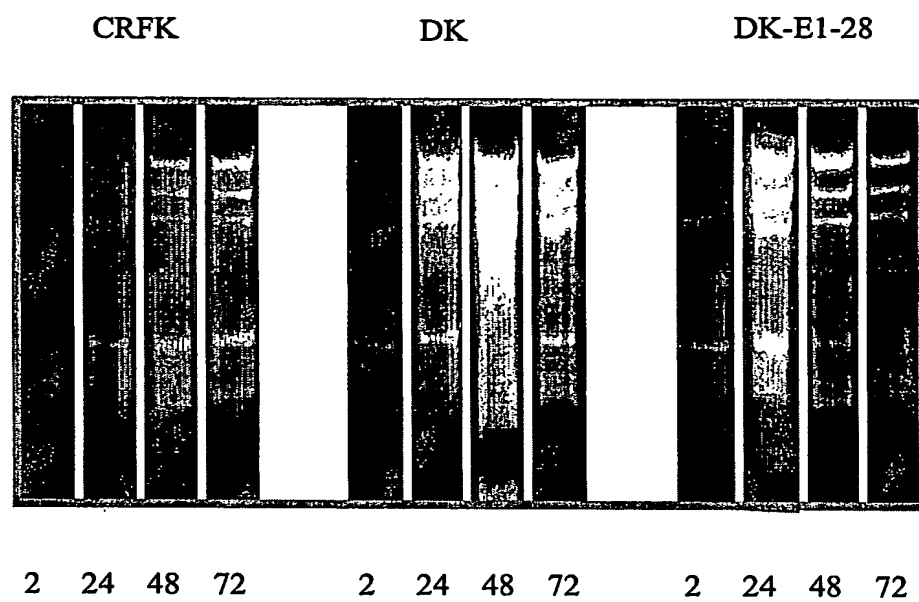


Figure 5

6/7

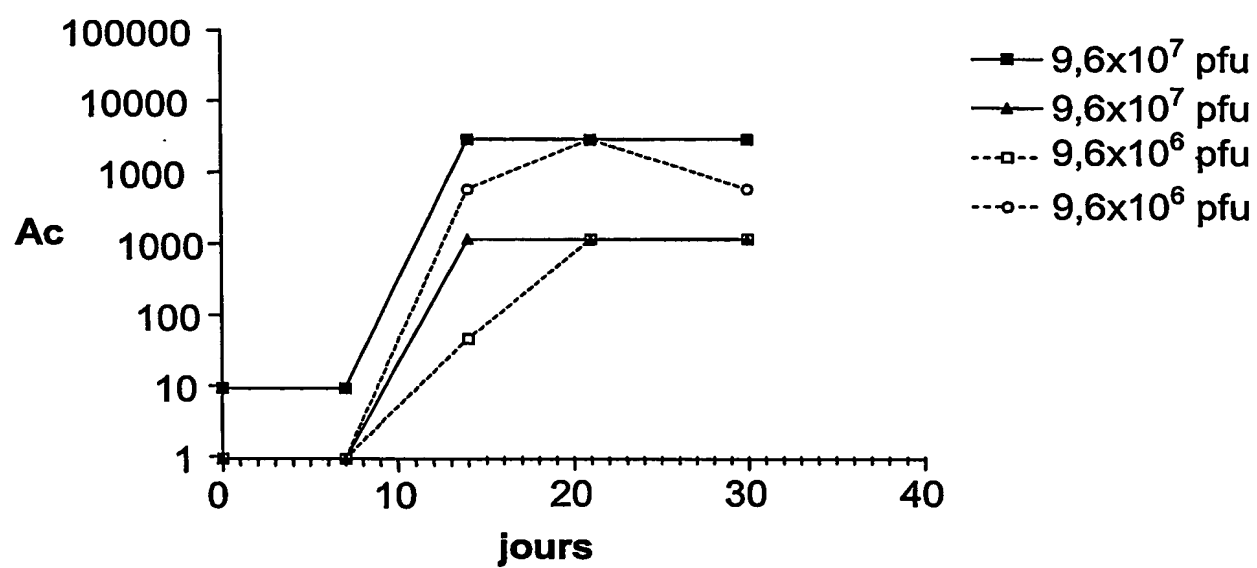


Figure 6

7/7

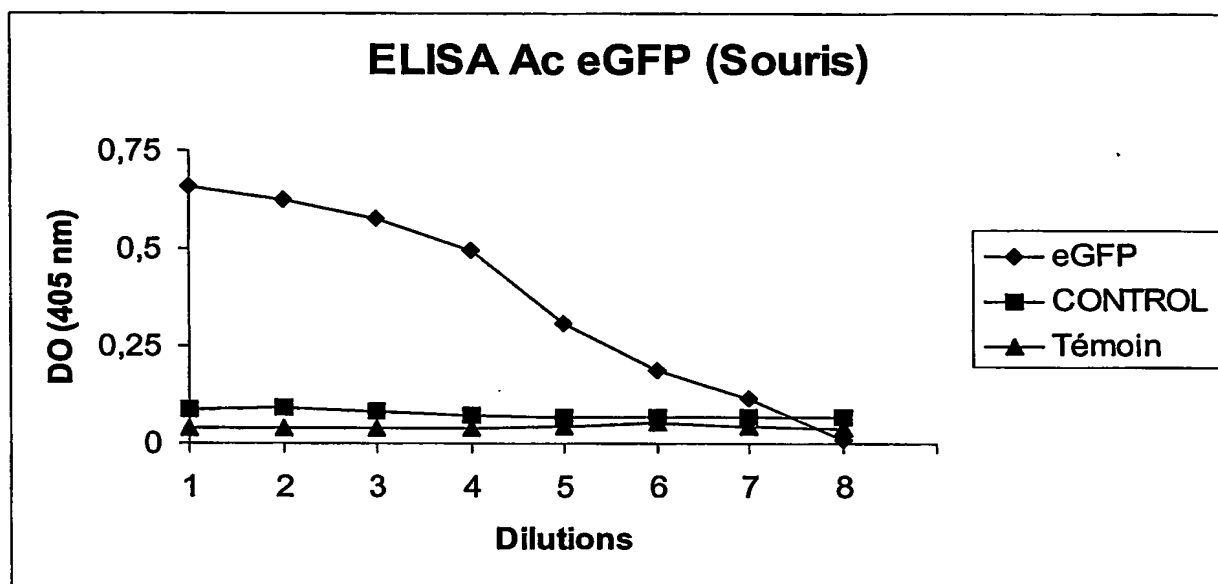


Figure 7

## LISTE DE SEQUENCES

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE  
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE D'ALFORT  
ELOIT, Marc  
KLONJKOWSKI Bernard.

<120> Vecteurs adénoviraux recombinants et leurs  
applications

<130> MJPbv539/109

<140>

<141>

<150> FR0212472

<151> 2002-10-08

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 32

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 1

ttggcgcgcc catcatcaat aatatacagg ac

32

<210> 2

<211> 27

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 2

gctctagacc tgcccaaaca ttttaacc

27

<210> 3

<211> 28

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 3

gctctagagg gtgattatta acaacgtc

28

<210> 4

<211> 32

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 4

ccgacgtcga ccataaactt tgacattagc cg

32

<210> 5

<211> 38

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 5

gctctagagc gaagatctcc aacagcaata cactcttg

38



<210> 6

<211> 30

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 6

gataaggatc acgcggcctt aaattctcag

30

<210> 7

<211> 32

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 7

gataaggatcaacagaaacactctgttctctg

32

<210> 8

<211> 40

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 8

agctttgttt aaacggcgcg ccgggatttt ggtcatgaac

40

<210> 9

<211> 37

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 9

ccggcgcgccc gtttaaaca agctatccgc tcatgaa

37

<210> 10

<211> 27

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 10

cggccgactc ttgagtgcgc agcgaga

27

<210> 11

<211> 29

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 11

ggcgcgccga gagacaacgc tggacacgg

29